

L2 ANSWER 3 OF 3 WPINDEX COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN  
AN 1988-051281 [08] WPINDEX  
DNC C1988-022679

TI Cosmetic compsn. contg. coenzymes or derivs. - used for preventing ageing,  
reducing wrinkles, etc..

DC D21 E11 E19

IN SUGIYAMA, K; TAKADA, K; YAMAMOTO, I  
PA (LIOY) LION CORP

CYC 12

PI EP 256472 A 19880224 (198808) \* EN 36  
R: AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

JP 63152309 A 19880624 (198831)

JP 63183535 A 19880728 (198836) <--

ADT EP 256472 A EP 1987-111541 19870810; JP 63152309 A JP 1987-195066  
19870804; JP 63183535 A JP 1987-227495 19870910

PRAI JP 1986-187983 19860811; JP 1986-220212 19860918;  
JP 1987-227495 19870910

REP 3.Jnl.Ref; A3...8836; DE 2139183; DE 2141764; DE 2330384; DE 2335035; GB  
2167957; JP 50031051; JP 71034440; No-SR.Pub; P8 1044046

IC A61K007-48; A61K031-70; C07H019-21

AB EP 256472 A UPAB: 19930923

Cosmetic agent for applicn. to the skin comprises at least one of  
5'-deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B12) or salts; FAD or salts, NAD,  
NADH, NADP, NADPH or salts, coenzyme A or salts, pyrroloquinoline quinone  
or salts and cpds. having a skeleton of formula (I).

Pref. compsn. comprises 0.001-5 wt.% active agent, 0.5-12 wt.%  
surfactant, 2-15 wt.% humectant, 0-80 wt.% oil, minor amts. of  
preservative and 11-95 wt.% purified water. Conventional cosmetic  
components are used.

USE/ADVANTAGE - Used for activating dermal cells and promoting  
metabolism, for preventing ageing of the skin and providing wrinkle-free,  
smooth, moist and young-looking skin. Compsns. are safe and without  
side-effects.

0/0

FS CPI

FA AB

MC CPI: D08-B09A; E05-G07; E06-D09; E07-A02D

START LOCAL KERMIT RECEIVE PROCESS

BINARY DATA HAS BEEN DOWNLOADED TO MULTIPLE FILES 'IMAGEnnn.TIF'

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-183535

⑫ Int.Cl.

A 61 K 31/70  
7/00

// C 07 H 31/70  
19/213

識別記号

ADA

ADT

厅内整理番号

7252-4C

F-7306-4C

W-7306-4C

7252-4C

7138-4C

⑬ 公開 昭和63年(1988)7月28日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全12頁)

⑭ 発明の名称 皮膚外用剤

⑮ 特願 昭62-227495

⑯ 出願 昭62(1987)9月10日

優先権主張 ⑰ 昭61(1986)9月18日 ⑯ 日本(JP) ⑮ 特願 昭61-220212

⑰ 発明者 杉山圭吉 神奈川県中郡大磯町石神台1丁目18番13号

⑰ 発明者 高田康二 神奈川県藤沢市大鋸909番地2

⑰ 発明者 山本郁雄 神奈川県小田原市蓮正寺585-24 コーポ・グラース402号

⑯ 出願人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号

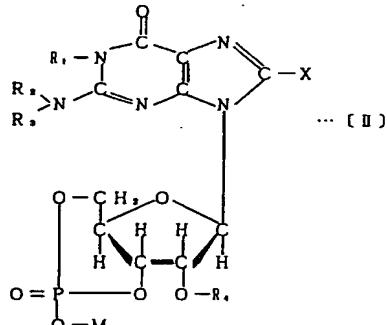
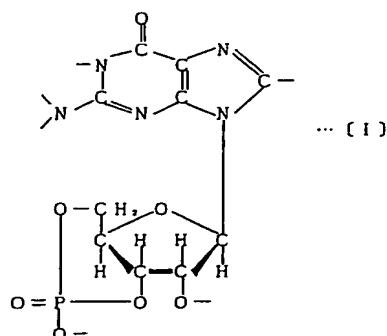
⑰ 代理人 弁理士 中村稔 外5名

明細書

1. 発明の名称 皮膚外用剤

2. 特許請求の範囲

(1) 下記〔I〕式で示される基本骨格を有する化合物を含有することを特徴とする皮膚外用剤。



(式〔II〕中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>は、水素、炭素数1～22のアシル基または炭素数1～22のアルキル基であり、Xは水素、ハロゲン、メルカプト基、チオ含有基、アミノ基、アミノアルキル基又は水酸基であり、Mは、水素または塩形成カチオンを示す。)

(2) 〔I〕式で示される基本骨格を有する化合物が、下記一般式〔II〕で表わされるグアノシン3',5'-環状一リン酸化合物である特許請求の範囲第(1)項記載の皮膚外用剤。

特開昭63-183535(2)

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、皮膚細胞の賦活化、新陳代謝の促進等により皮膚の老化を防止し、しわのない、滑らかでしっとりした若々しい肌を与える化粧用クリーム、軟膏などの皮膚外用剤に関するものである。

## 〔従来の技術〕

従来より、皮膚の老化を防止する目的で天然物から抽出した動植物エキス類、ビタミン類、アミノ酸類、核酸類等が化粧料等の皮膚外用剤に配合されているが、これらの有する作用は補助的な作用であるため、比較的多量に配合しても皮膚に対する顕著な老化防止効果は期待できなかった。

一方、生体内に微量に存在する生理活性物質であるプロスタグランジン(特開昭48-18436号)、EGF(上皮細胞増殖因子)、ウロガストロンを化粧料に利用すること(特開昭61-5006号)等が提案されている。しかしながら、これらの方法は、

(i) 该化合物が高分子量の物質であるため、

細胞への透過性が低く、十分な効果を發揮し得ない、

(ii) EGF及びウロガストロンは蛋白系の物質であるため、細胞内でプロテアーゼにより分解されやすく、十分な効果を發揮し得ない、

(iii) 他方、副作用を生じる恐れがあり、安全性上の問題点がある、

等の理由により実用性に乏しい。

## 〔発明が解決しようとする問題点〕

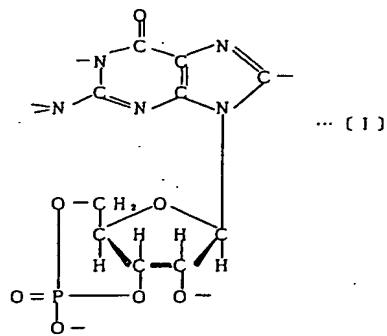
従って、本発明は、しわの発生等、皮膚の老化現象に対してすぐれた老化防止効果があり、かつ副作用がなく安全性の高い実用的な皮膚外用剤を提供することを目的とする。

## 〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、生体の各組織、細胞に微量存在し、種々の調節機能を有すると考えられている特定の核酸関連物質が、皮膚の老化防止に対してすぐれた作用を有することを見出し、該化合物を皮膚外用剤に含有させると上記問題点を有効に解決できるとの知見に基づいてなされたのである。

3

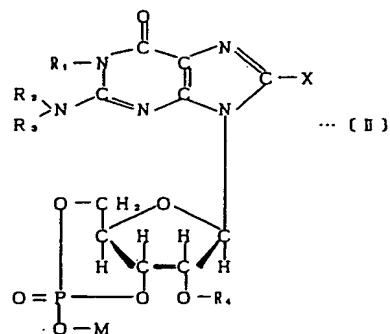
すなわち、本発明は、下記〔I〕式で示される基本骨格を有する化合物を含有することを特徴とする皮膚外用剤を提供する。



従って、上記〔I〕式で示される基本骨格を有する化合物であれば、どのような化合物でも用いることができる。詳しくは、下記一般式〔II〕で表わされるグアノシン3',5'-環状リボヌクレオチド(式〔II〕中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、X、Mがいずれも水素の化合物:以下cGMPと略称

4

する。)、その特定の誘導体及びその塩を用いることができる。



(式〔II〕中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>は、水素、炭素数1~22のアシル基または炭素数1~22のアルキル基であり、Xは、水素、ハロゲン、メルカプト基、チオ含有基、アミノ基、アミノアルキル基又は水酸基であり、Mは、水素または塩形成カチオンを示す。)

ここで、式〔II〕中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>

5

6

特開昭63-183535(3)

としては、水素、炭素数1～22、とりわけ炭素数1～12のアシル基、炭素数1～22、とりわけ炭素数1～12のアルキル基が好ましい。

また、Xとしては、水素、臭素、沃素、塩素、弗素などのハロゲン、メルカプト基、炭素数1～4のチオアルキル基、4-クロロフェニルチオ基、チオベンジル基等のチオ含有基、アミノ基、炭素数1～4のアミノアルキル基、水酸基が好ましく、Mとしては、水素やナトリウム、カリウム、リチウムなどのアルカリ金属、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンが好ましい。

尚、アシル基、アルキル基にはハロゲン等の置換基があつてもよく、芳香族環を含んでいてもよい。また、二塩基酸由來のアシル基でもよい。

本発明で用いるcGMPは生体内に微量存在し、各種ホルモン作用の調整機能を有する等、最近その重要性が認められつつある物質である。現在、生化学試薬として酵酇法または合成法で製造されたcGMP及び各種誘導体が市販されている。

本発明で用いる一般式〔II〕で表わされる化合

物としては、具体的には、表-1に示される化合物とそれらのナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等の1種又は2種以上の混合物が例示される。なお、表-1中、C&P<sub>h</sub>Sは4-クロロフェニルチオ基を表わす(以下、同じ)。

表-1

グループ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
1	H	H	H	H	H
2	アセチル ブチリル ヘキサノイル サクシニル エチル	H	H	H	H
3	アセチル ブチリル サクシニル	H	H	H	C& Br C&P <sub>h</sub> S
4	H	H	アセチル ブチリル ヘキサノイル	H	H

表-1(続)

グループ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
4	H	オクタノイル ラウロイル マロニル サクシニル ベンゾイル メチル エチル エチル	H	H	H
5	H	アセチル アセチル ブチリル ブチリル	H	H	アミノメチル Br C&P <sub>h</sub> S

表 - 1 (続)

グルーブ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
5	H	サクシニル	H	H	Br
	H	サクシニル	H	H	C <sub>6</sub> PhS
	H	エチル	H	H	C <sub>6</sub>
	H	エチル	H	H	メルカブト
6	H	H	H	アセチル	H
	H	H	H	ブチリル	H
	H	H	H	ヘキサノイル	H
	H	H	H	オクタノイル	H
	H	H	H	ラウロイル	H
	H	H	H	マロニル	H
	H	H	H	サクシニル	H
	H	H	H	ベンゾイル	H

1 3

表 - 1 (続)

グルーブ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
5	H	サクシニル	H	H	Br
	H	サクシニル	H	H	C <sub>6</sub> PhS
	H	エチル	H	H	C <sub>6</sub>
	H	エチル	H	H	メルカブト
6	H	H	H	アセチル	H
	H	H	H	ブチリル	H
	H	H	H	ヘキサノイル	H
	H	H	H	オクタノイル	H
	H	H	H	ラウロイル	H
	H	H	H	マロニル	H
	H	H	H	サクシニル	H
	H	H	H	ベンゾイル	H

1 3

表 - 1 (続)

グルーブ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
6	H	H	H	メチル	H
	H	H	H	エチル	H
	H	H	H	アセチル	アミノメチル
	H	H	H	ブチリル	Br
	H	H	H	ブチリル	C <sub>6</sub> PhS
	H	H	H	サクシニル	Br
	H	H	H	サクシニル	C <sub>6</sub> PhS
	H	H	H	エチル	C <sub>6</sub>
	H	H	H	メチル	メルカブト
7	H	H	H	アセチル	アミノメチル
	H	H	H	ブチリル	Br
	H	H	H	ブチリル	C <sub>6</sub> PhS
	H	H	H	サクシニル	Br
	H	H	H	サクシニル	C <sub>6</sub> PhS
	H	H	H	エチル	C <sub>6</sub>
	H	H	H	エチル	メルカブト
8	H	H	H	H	Br
	H	H	H	H	C <sub>6</sub>

1 2

特開昭63-183535(4)

表 - 1 (続)

グルーブ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
1 1	H	H	アセチル	H	H
	H	H	ブチリル	H	アセチル
	H	H	ヘキサノイル	H	ブチリル
	H	H	オクタノイル	H	ヘキサノイル
	H	H	ラウロイル	H	オクタノイル
	H	H	マロニル	H	ラウロイル
	H	H	サクシニル	H	マロニル
	H	H	ベンゾイル	H	サクシニル
	H	H	メチル	H	ベンゾイル
	H	H	エチル	H	メチル
1 2	H	H	アセチル	H	アセチル
	H	H	ブチリル	H	ブチリル
	H	H	サクシニル	H	サクシニル
	H	H	エチル	H	サクシニル

1 2

表 - 1 (続)

グループ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
12	H	ブチリル	H	ブチリル	B <sub>r</sub>
	H	ブチリル	H	ブチリル	C <sub>6</sub> PhS
	H	サクシニル	H	サクシニル	B <sub>r</sub>
	H	サクシニル	H	サクシニル	C <sub>6</sub> PhS
13	H	エチル	H	エチル	C <sub>2</sub>
	H	エチル	H	エチル	メルカブト
	H	アセチル	H	アセチル	H
14	アセチル	H	H	アセチル	C <sub>4</sub>
	ブチリル	H	H	ブチリル	B <sub>r</sub>
	サクシニル	H	H	サクシニル	C <sub>6</sub> PhS

15

本発明で用いる上記核酸関連物質は、製品形態、使用頻度にもよるが、通常、各種皮膚外用剤中に0.01～5重量%（以下、%と略称する。）、好ましくは0.1～2%含有させるのがよい。

本発明の皮膚外用剤には、上記必須成分の他に、油分、水、界面活性剤、保湿剤、低級アルコール、増粘剤、酸化防止剤、キレート剤、pH調整剤、防腐剤、香料、色素等通常化粧料に用いられる原料を配合可能である。具体的には、油分としては、オリーブ油、ホホバ油、硬化油等の油脂類、蜂ロウ、蜜ロウ、ラノリン等のロウ類、流動パラフィン、セレシン、スクワラン等の炭化水素類、ステアリン酸、オレイン酸等の脂肪酸類、セタノール、ステアリルアルコール、ラノリンアルコール、ヘキシルデカノール等のアルコール類、ミリスチン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル等のエステル類などが例示される。また、界面活性剤としては、ステアリン酸ナトリウム、セチル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテルリン酸、N-アシルグルタミン酸ナトリウム等のアニ

表 - 1 (続)

グループ	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	X
15	アセチル	アセチル	H	ブチリル	H
	ブチリル	ブチリル	H	ブチリル	H
16	サクシニル	サクシニル	H	サクシニル	H
	アセチル	アセチル	H	アセチル	C <sub>4</sub>
	ブチリル	ブチリル	H	ブチリル	B <sub>r</sub>
	サクシニル	サクシニル	H	サクシニル	C <sub>6</sub> PhS

16

オン界面活性剤、塩化ステアリルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム等のカチオン界面活性剤、塩酸アルキルアミノエチルグリシン液、レシチン等の両性界面活性剤、モノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸ソルビタン、ショ糖脂肪酸エステル、モノステアリン酸プロピレングリコール、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、モノステアリン酸ポリエチレングリコール、モノパルミチン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリオキシエチレンヤシ脂肪酸モノエタノールアミド、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレンラノリン等の非イオン界面活性剤等を例示することができる。さらに、保湿剤としては、グリセリン、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール等を、低級アルコールとしては、エタノール、イソプロパノール等を、増粘剤としては、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム等を、酸化防止剤としては、ジブチル

特開昭63-183535(6)

ヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、没食子酸プロピル等を、キレート剤としては、エデト酸二ナトリウム、エタンヒドロキシジホスフェート等を、pH調整剤としては、クエン酸、クエン酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂、リン酸一水素ナトリウム等を、防腐剤としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、デヒドロ酢酸、サリチル酸、安息香酸等をそれぞれ例示することができる。尚、任意成分は、これらに限定されるものではない。上記必須成分と任意成分を適当に配合することにより、例えば、必須成分0.01～5%、任意成分として油分0～80%：界面活性剤0.5～1.2%、保湿剤2～15%、精製水11～95%、防腐剤微量を含有する皮膚外用剤を提供することができる。具体的には、化粧水、クリーム、パック剤、ローション、スキンミルク、乳剤、軟膏等種々の製品形態として用いることが可能である。

具体例を示すと、化粧水としては：

本発明の必須成分0.01～2%、低級アルコ

ル2～10%、界面活性剤0.5～1%、保湿剤3～7%、pH調整剤0.05～0.2%、精製水80～95%、防腐剤微量、色素微量、香料微量を含有する組成物、

皮膚用クリームとしては：

必須成分0.01～2%、油分20～70%、界面活性剤2～7%、保湿剤5～10%、精製水11～73%、防腐剤微量、香料微量を含有する組成物、

ローションとしては：

必須成分0.01～2%、低級アルコール5～10%、界面活性剤0.5～2%、保湿剤2～8%、酸化防止剤0.01～0.05%、キレート剤0.02～0.1%、pH調整剤0.1～1%、精製水77～92%、防腐剤微量、香料微量を含有する組成物、

スキンミルクとしては：

必須成分0.01～2%、油分20～40%、界面活性剤2～5%、精製水53～78%、防腐剤微量、香料微量を含有する組成物、

乳液としては：

19

20

必須成分0.01～2%、油分10～30%、界面活性剤1～5%、保湿剤5～10%、精製水53～84%、防腐剤微量、香料微量を含有する組成物、

軟膏としては：

必須成分0.01～2%、油分40～60%、界面活性剤1～1.2%、保湿剤8～15%、精製水12～51%、防腐剤微量を含有する組成物

(親水型軟膏)、及び必須成分0.01～2%、油分95～99%、精製水0～5%含有する組成物(油性型軟膏)、があげられる。

本発明の皮膚外用剤が、しわの発生等、皮膚の老化現象に対して優れた老化防止作用を発揮する作用の詳細は不明であるが、先ず皮膚の老化の発生の主原因は、皮膚組織の表面にある表皮の状態よりも、むしろ真皮を構成するコラーゲン、エラスチンという線維蛋白が老化とともに減少し、かつその構造変化、脆弱化が起こるためにあると推定した。そこで、真皮中でコラーゲン、エラスチンを生産、分泌する細胞である線維芽細胞の増殖

促進物質を後述の実験に基づいて広く探索したところ、本発明の必須成分が線維芽細胞の増殖に基づくコラーゲン生成促進作用及び線維化促進作用を有することが明らかになった。さらには、メラニン色素の生成・沈着抑制作用を有することが明らかになり、実施例に示すように人体に対してもしわの発生等の皮膚老化に対する優れた防止、改善効果が確認された。

従って、該化粧料を皮膚に施すと、経皮吸収により真皮線維芽細胞の増殖促進作用、コラーゲン・エラスチン線維の生産促進作用、メラニン色素代謝抑制作用等の結果として、上記すぐれた効果が発揮されるものと推定される。

尚、本発明で用いる上記既知関連物質は、本来生体内に広く存在するものであり、安全性は極めて高いと考えられるが、念のため安全性を確認したところ、急性毒性、皮膚刺激性、皮膚感作性等の点で実用上特に問題は認められず、安全性が高いことが確認された。

21

22

特開昭63-183535(7)

## 〔発明の効果〕

本発明によれば、皮膚細胞の賦活化、皮膚の老化防止作用により、しわの発生を予防し、滑らかでしっとりした若々しい肌を与えることができ、従来品よりも格段にすぐれた効果を有し、かつ安全性も極めて高い化粧料等の皮膚外用剤が提供される。また、本発明の皮膚用外用剤はしわの発生を予防できるというすぐれた効果をも有するのである。

従って、本発明の皮膚外用剤は、各種化粧用クリーム、化粧水、ローション、スキンミルク、乳液、パック剤、軟膏などの種々の形態で幅広く使用できる。

次に、試験例及び実施例により本発明を説明する。

## 〔試験例〕

## 試験例 1

本発明で用いる核酸関連物質の線維芽細胞増殖促進作用を下記のようにして評価した。

ヒト真皮由来線維芽細胞を血清抑制条件下で上

記化合物を添加及び無添加の培地で培養し、その増殖に及ぼす影響を調べた。

即ち、イーグルMEM培地に牛胎児血清10%等を加えた培地(pH 7.6)で上記細胞を24時間、37度でCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した後、血清を1%に抑制した培地に交換し、さらに24時間培養した。ここで被検物質10<sup>-5</sup>Mと血清1%を含む培地に交換し、培養を続けた。

以後、培地の交換は1日おきに行なった。結果を表-2に示す。ここでは被検物質無添加の場合(コントロール)の14日後の細胞数を100として、被検物質を添加した場合の細胞数を相対値で示した。

表-2においては以下の略号を用いた(以下同じ)。

M B ; モノブチリル  
M S ; モノサクシニル  
C & PhS ; 4-クロロフェニルチオ  
D B ; ジブチリル  
D S ; ジサクシニル

23

また、cGMP誘導体の置換基の位置は次のように示した。

N<sup>3</sup> ; R<sub>1</sub> または R<sub>2</sub> が水素以外の場合の結合位置。

O<sup>2'</sup> ; R<sub>1</sub> が水素以外の場合の結合位置。

8 ; X が水素以外の場合の結合位置。

表-2

被検物質	細胞数
無添加(コントロール)	100
cGMP・Na	136
N <sup>3</sup> -MBcGMP・Na	139
N <sup>3</sup> -MScGMP・Na	136
N <sup>3</sup> -MB-8-BrcGMP・Na	135
N <sup>3</sup> -MB-8-C & PhScGMP・Na	137
N <sup>3</sup> -MS-8-BrcGMP・Na	135
N <sup>3</sup> -MS-8-C & PhScGMP・Na	136
O <sup>2'</sup> -MBcGMP・Na	133
O <sup>2'</sup> -MScGMP・Na	136
O <sup>2'</sup> -MB-8-BrcGMP・Na	135

24

被検物質	細胞数
O <sup>2'</sup> -MB-8-C & PhScGMP・Na	139
O <sup>2'</sup> -MS-8-BrcGMP・Na	138
O <sup>2'</sup> -MS-8-C & PhScGMP・Na	134
8-BrcGMP・Na	137
8-C & PhScGMP・Na	139
N <sup>3</sup> , O <sup>2'</sup> -DBcGMP・Na	141
N <sup>3</sup> , O <sup>2'</sup> -DScGMP・Na	145
N <sup>3</sup> , O <sup>2'</sup> -DB-8-BrcGMP・Na	140
N <sup>3</sup> , O <sup>2'</sup> -DB-8-C & PhScGMP・Na	145
N <sup>3</sup> , O <sup>2'</sup> -DS-8-BrcGMP・Na	141
N <sup>3</sup> , O <sup>2'</sup> -DS-8-C & PhScGMP・Na	143

表-2の結果から、本発明の有効成分はいずれも顕著なヒト線維芽細胞の増殖促進作用を示すことがわかる。

皮膚の真皮中に存在する線維芽細胞は、コラーゲン、エラスチンという皮膚の柔軟性、弾力性維持を担う構造蛋白質を生産する細胞である。従って、線維芽細胞の増殖が促進されるということは、

25

—317—

26

特開昭63-183535(8)

コラーゲン、エラスチンの生産が促進され、その結果として皮膚の柔軟性、弾力性が改善されるための必要条件である。

## 試験例 2

本発明で用いる核酸関連物質のコラーゲン生成促進作用を下記のようにして評価した。

ウィスター (Wistar) 系 6 週齢雄性ラット 6 匹を 1 群とし、ラットの背部を除毛後、皮膚を円形 (直径約 1.5 cm) に切除し、上記化合物 5.0 mM を含む 1.0% エタノール溶液またはこれらを含まない 1.0% エタノール溶液 (コントロール) 各 0.1 ml を毎日 2 回、連続 6 日間塗布した。7 日目に屠殺後、術部を切り出し、新たに形成された真皮である肉芽の重量及びコラーゲン特有の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリン量を再生されたコラーゲン量の指標として測定した。結果を表-3 に示す。ここではコントロールの肉芽重量及びヒドロキシプロリン量をそれぞれ 1.00 として、相対値で示した。

表-3

被検物質	肉芽重量	ヒドロキシプロリン量
無添加 (コントロール)	1.00	1.00
cGMP・Na	1.35	1.25
N <sup>2</sup> -MBcGMP・Na	1.45	1.28
N <sup>2</sup> -MScGMP・Na	1.44	1.27
N <sup>2</sup> -MB-8-BrcGMP・Na	1.49	1.30
N <sup>2</sup> -MB-8-C & PhScGMP・Na	1.55	1.31
N <sup>2</sup> -MS-8-BrcGMP・Na	1.48	1.28
N <sup>2</sup> -MS-8-C & PhScGMP・Na	1.53	1.32
O <sup>2</sup> -MBcGMP・Na	1.38	1.25
O <sup>2</sup> -MScGMP・Na	1.39	1.26
O <sup>2</sup> -MB-8-BrcGMP・Na	1.45	1.28
O <sup>2</sup> -MB-8-C & PhScGMP・Na	1.51	1.30
O <sup>2</sup> -MS-8-BrcGMP・Na	1.44	1.28
O <sup>2</sup> -MS-8-C & PhScGMP・Na	1.53	1.31
8-BrcGMP・Na	1.48	1.30
8-C & PhScGMP・Na	1.57	1.33

27

28

被検物質	肉芽重量	ヒドロキシプロリン量
N <sup>2</sup> , O <sup>2</sup> -DBcGMP・Na	1.74	1.38
N <sup>2</sup> , O <sup>2</sup> -DScGMP・Na	1.71	1.38
N <sup>2</sup> , O <sup>2</sup> -DB-8-BrcGMP・Na	1.72	1.36
N <sup>2</sup> , O <sup>2</sup> -DB-8-C & PhScGMP・Na	1.74	1.37
N <sup>2</sup> , O <sup>2</sup> -DS-8-BrcGMP・Na	1.71	1.35
N <sup>2</sup> , O <sup>2</sup> -DS-8-C & PhScGMP・Na	1.73	1.34

表-3 の結果から、本発明の有効成分にはいずれも再生肉芽重量及びヒドロキシプロリン量の明らかな増加が認められ、真皮中のコラーゲン量が増加したことを示している。

即ち、皮膚真皮中に存在する線維芽細胞の増殖が促進された結果として真皮肉芽重量が増大し、それとともにコラーゲンの生産が促進され、弾力性の低下、小じわの発生等の皮膚の老化を防止改善することが可能となることを示している。

## 試験例 3

本発明の有効成分が、真皮中のコラーゲン・エ

ラスチン線維の強度に与える影響について下記のようにして評価した。

ウィスター (Wistar) 系 6 週齢雄性ラット 8 匹を 1 群とし、ラットの背部を除毛後、メスで背部正中線に沿って 4 cm の鋭利な線状創を作成し、均等な間隔で 3 カ所ミッヘル針により縫合した。ミッヘル針は術後 4 日目に取りはずした。被検物質 5.0 mM を含む生理食塩水またはこれらを含まない生理食塩水 (コントロール) 各 0.1 ml を毎日 1 回連続 7 日間、切創部に投与した。8 日目に屠殺後、切創部の皮膚を切り出し、切創部に直交する幅 1 cm の皮膚片を個体毎に 3 個ずつ作成し、引張り強度試験機により切創部皮膚片が切断されるに要した張力 (Tensile strength, g/cm) を測定して、再生したコラーゲン・エラスチン線維の強度の指標とした。

結果を表-4 に示す。ここではコントロールの引張り強度を 1.00 として相対値で示した。

29

30

特開昭63-183535(9)

表 - 4

被検物質	引張り強度
無添加 (コントロール)	100
cGMP・Na	118
N <sup>3</sup> -MBcGMP・Na	120
O <sup>3'</sup> -MBcGMP・Na	121
N <sup>3</sup> , O <sup>3'</sup> -DBcGMP・Na	123
N <sup>3</sup> , O <sup>3'</sup> -DScGMP・Na	123
8-BrcGMP・Na	121

本試験においては、相対値で110以上の値を示せば、一般に引張り強度が改善されたと判断されるが、表-4の結果から、本発明の有効成分には、いずれも再生したコラーゲン・エラスチン線維の引張り強度の明らかな増大が認められた。

即ち、再生したコラーゲン・エラスチン線維の引張り強度が増大したことにより、皮膚の弾力性、柔軟性が改善される可能性を示している。

31

このようにして調製したクリームのメラニン色素生成・沈着に及ぼす影響を次のようにして評価した。

有色モルモット（1群3匹）の背部を除毛後有効成分0.5%を配合したクリームとこれら有効成分を含まないクリームを毎日朝夕2回、連続14日間塗布した。そして塗布前後の皮膚の色調の違いを色差計にて測定した。結果を表-6に示す。

表 - 6

被検物質	テスト前	テスト後
無添加 (コントロール)	36.2	36.3
cGMP・Na	36.0	43.0
N <sup>3</sup> -MBcGMP・Na	36.2	44.6
N <sup>3</sup> -MScGMP・Na	36.1	44.6
O <sup>3'</sup> -MBcGMP・Na	36.3	43.7
O <sup>3'</sup> -MScGMP・Na	36.3	43.8
N <sup>3</sup> , O <sup>3'</sup> -DBcGMP・Na	36.2	45.5
N <sup>3</sup> , O <sup>3'</sup> -DScGMP・Na	36.1	45.3

33

## 【実施例】

## 実施例1

表-5に示す成分1～6及び成分7～10を別々に80℃で加熱溶解した後混合乳化し、冷却中に成分11を加え、均一に分散して表-5に示すクリームを調製した。尚、表中の数値は重量%である（以下、同じ）。

表 - 5

	本発明品	比較例
1 ラノリーン	2.5	2.5
2 モノステアリン酸ソルビタン	5.0	5.0
3 モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン	2.0	2.0
4 蜜ロウ	10.0	10.0
5 流動パラフィン	22.0	22.0
6 硬化油	23.0	23.0
7 パラオキシ安息香酸エチル	0.2	0.2
8 ホウ砂	0.5	0.5
9 有効成分	0.5	—
10 精製水	33.8	34.3
11 香料	0.5	0.5

32

被検物質	テスト前	テスト後
8-BrcGMP・Na	36.2	45.4
8-C <sub>2</sub> PhScGMP・Na	36.2	45.3

表中の数値はL値（明度）を示し、値が大きい程皮膚が白いことを示す。

表-6の結果から明らかなように、cGMP及びその誘導体を配合したクリームは、コントロールに比べ脱色効果が優れていることがわかる。

即ち、本発明の有効成分は、メラニン色素の生成・沈着抑制作用を有することを示している。

## 実施例2

表-7に示す成分3及び7～9の均一混合物を、それ以外の成分を溶解した水溶液に添加して可溶化し、表-7に示す化粧水を調製した。

34

特開昭63-183535(10)

表 - 7

に示す。

成 分		本発明品	比較例
1	$N^{\circ}, O^{\prime\prime} - DBcGMP \cdot Na$	0.1	—
2	グリセリン	3.0	3.0
3	エタノール	10.0	10.0
4	クエン酸	0.02	0.02
5	クエン酸ナトリウム	0.05	0.05
6	精製水	86.33	86.43
7	ポリオキシエチレンヒマシ油	0.5	0.5
8	香 料	微量	微量
9	防腐剤	微量	微量

次に、このようにして調製した化粧水の有効性を下記のようにして評価した。

20名の女性(30才~50才)に1日2回(朝、夜)、連続3ヶ月間、本発明品と比較例をハーフ・フェイス法で左右顔面に別々に使用させた後、皮膚の弾力性、皮膚のつや、肌荒れ、小じわの改善の程度を調べた。結果をまとめて表-8

35

36

評価項目	本発明品が 改善の 度	比較例が 改善の 度		
		ややよい い	よ い	よ い
皮膚の弾力性	11	6	7	8
皮膚のつや・肌荒れの改善	11	3	5	6
皮膚の改善	10	4	6	7

表 - 8

表-8の結果から、 $N^{\circ}, O^{\prime\prime} - DBcGMP \cdot Na$ を配合した本発明の化粧水は、無添加の比較例と比べて皮膚の弾力性、つや、肌荒れ及び小じわの改善の何れについてもすぐれた効果を示した。

以上の結果から、 $N^{\circ}, O^{\prime\prime} - DBcGMP \cdot Na$ が皮膚の賦活化、老化防止に優れた効果を有することは明らかである。

なお、上記化粧水を3ヶ月間使用中及び使用後において、皮膚の状態に異常は認められなかった。尚、本発明の化粧水で用いた $N^{\circ}, O^{\prime\prime} - DBcGMP \cdot Na$ の安全性試験の結果を次に示す。

急性経口毒性(ラット) : LD<sub>50</sub>値 : 5 g/kg以上

#### 皮膚刺激性

- (1)一次刺激性(モルモット) : 5% ; 無刺激
- (2)光毒性(モルモット) : 陰性
- (3)眼粘膜刺激性(ウサギ) : 5% ; 無刺激

#### 皮膚感作性

- (1)感作性(モルモット) : 陰性

37

38

特開昭63-183535(11)

## (2)光感作性(モルモット):陰性

ヒトパッチテスト: 5%:無刺激

以上の結果より、N<sup>+</sup>、O<sup>+</sup> - DBcGMP・Na の安全性は極めて高いことが確認された。

## 実施例3

表-9に示す成分1~5及び成分6~10を別々に80℃にて加熱溶解した後、両者を混合乳化し、冷却中に、成分11を加え、均一に分散して、表-9の乳液を調製した。

表-9

成 分		本発明品	比較例
1	ステアリン酸	2.5	2.5
2	セタノール	1.5	1.5
3	ワセリン	5.0	5.0
4	流動パラフィン	10.0	10.0
5	モノオレイン酸ポリエチレングリコール1500	2.0	2.0
6	ポリエチレングリコール1500	3.0	3.0
7	トリエタノールアミン	1.0	1.0
8	cGMP・Na	1.0	—
9	防腐剤	微量	微量
10	精製水	74.0	75.0
11	香料	微量	微量

このようにして調製した乳液の有効性を20名の女性に使用させ実施例2と同様にして調べた。結果をまとめて表-10に示す。

39

40

表-10

評価項目	本発明品がよりよい	0	0	0
	本発明品がややよい	0	0	0
	等同	4	6	7
	本発明品がやや悪い	6	7	6
	本発明品が悪い	10	7	7
皮膚の弾力性改善	著	著	著	やや
皮膚のつや・肌荒れの改善	著	著	著	やや
皮膚の潤滑性改善	著	著	著	やや

表-10の結果から、cGMP・Naを配合した本発明の乳液は、無添加の比較例に比べて各評価項目ともすぐれた効果を示した。なお、上記乳液の3ヵ月間使用中及び使用後において、皮膚の状態に異常は認められなかった。

cGMP・Naの安全性を実施例2と同じ方法で実験したところ、皮膚刺激等の問題点は全く認められず、安全性が極めて高いことが確認された。

## 実施例4

N<sup>+</sup>、O<sup>+</sup> - DBcGMP・Naの代りに、N<sup>+</sup>-MBcGMP・Na、O<sup>+</sup> - M B c G M P - N a 、N<sup>+</sup>、O<sup>+</sup> - D S c G M P - N a または8-BrcGMP・Naを用いた以外は実施例2と同様にして皮膚の老化防止効果を調べたところ、実施例2と同様のすぐれた効果が得られた。

## 実施例5

表-11に示す組成の軟膏を調製し、色素斑(しみ・そばかす)のある男女6名の色素斑部に毎日朝夕2回、3ヵ月間該軟膏を塗布した。そして塗布前後での色素斑の明度を色差計により測定

41

42

特開昭63-183535(12)

した。表-12に結果を示す。

表-11

成 分	本発明品		比較例
	I	II	
白色ワセリン	25.0	25.0	25.0
ステアリルアルコール	25.0	25.0	25.0
プロビレングリコール	12.0	12.0	12.0
ラウリル硫酸ナトリウム	1.0	1.0	1.0
N <sup>3</sup> , O <sup>2'</sup> -DBcGMP・Na	0.1	—	—
cGMP・Na	—	0.1	—
防腐剤	微量	微量	微量
精製水	36.9	36.9	37.0

表-12

	本発明品		比較例
	I	II	
テスト前	44.7	44.6	44.7
テスト後	50.5	49.0	44.8

43

表中のテスト前後の数値はし値(明度)を示す。

表-12の結果から明らかのように、N<sup>3</sup>, O<sup>2'</sup> -DBcGMP・NaまたはcGMP・Naを配合した軟膏は、これらを配合しない軟膏(比較例)に比べて、色素斑の明度が増大していることがわかる。即ち、本発明の有効成分であるcGMP及びその誘導体は、しわの改善効果に加えて色素斑(しみ・そばかす)の改善効果も優れていることがわかる。なお、上記軟膏を3ヶ月間使用中及び使用後において、皮膚の状態に異常は認められなかった。

## 実施例6

実施例5で用いたN<sup>3</sup>, O<sup>2'</sup> -DBcGMP・Na、cGMP・Naの代りに、N<sup>3</sup> -MBCGMP・Na、O<sup>2'</sup> -MBCGMP・Naまたは8-Br cGMP・Naを配合したクリームを調製し、実施例5と同様にして評価したところ、実施例5とほぼ同等の色素斑改善効果が得られた。

44